

Determinación espectrofotométrica de pH en agua de mar utilizando el kit REMARCO



REMARCO
REMARCO-AO-06
V.01

Octubre, 2023

TABLA DE CONTENIDO

1	OBJETIVO	2
2	ALCANCE.....	2
3	TÉRMINOS Y DEFINICIONES	2
4	FUNDAMENTO TEÓRICO	3
5	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	5
5.1	Materiales	5
5.2	Reactivos.....	5
5.3	Equipos.....	5
6	DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES.....	7
6.1	Solución indicadora de mCP.....	7
6.2	Preparación de los equipos.....	7
6.3	Medición de pH_T en la muestra	8
6.4	Verificación del método con Buffer TRIS.....	9
6.5	Obtención de datos y cálculos de pH_T.....	9
6.5.1	Registro de datos.....	9
6.5.2	Cálculos	10
6.5.2.1	Determinación del pH de la muestra	10
6.5.2.2	Incertidumbre de la muestra	11
7	CONTROL DE CALIDAD	12
8	MANEJO DE RESIDUOS	12
9	DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	12
10	ANEXOS	14
10.1	Configuración del espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS™ 150 UV-Vis ...	14
10.1.1	Modo barrido.....	14
10.1.2	Modo longitudes de onda múltiples	18
10.1.3	Lectura de muestras	18
10.2	Corrección de la perturbación del pH por adición del indicador	18
10.3	Corrección por utilización del indicador mCP no purificado según Douglas y Byrne (2017)	19



1 OBJETIVO

Describir la metodología analítica para la determinación espectrofotométrica de pH en escala total del ion hidrógeno (pH_T) en agua de mar con celda de 1 cm de paso óptico utilizando el kit REMARCO.

2 ALCANCE

Este protocolo está dirigido a los laboratorios de la red REMARCO y a todo laboratorio que quiera implementar la medición de pH para agua de mar ($20 \leq \text{Salinidad} \leq 40$ y $5 \text{ °C} \leq \text{Temperatura} \leq 35 \text{ °C}$) por método espectrofotométrico con celda de 1 cm de paso óptico cumpliendo con la categoría de calidad “weather” (incertidumbre del pH $\pm 0,02$, indicador 14.3.1 ODS), utilizando indicador púrpura de meta-Cresol (mCP).

Este protocolo fue adaptado del procedimiento estándar de operación 6b (Dickson et al., 2007) y el método REMARCO-AO-P-02 (Gómez et al., 2021) para el uso del equipamiento incluido en el kit de Acidificación Oceánica REMARCO.

El kit de Acidificación Oceánica REMARCO corresponde al equipamiento y materiales provistos a los Estados Miembros de la Red REMARCO para la creación de capacidades en la medición de sistema de carbonatos en el contexto de la acidificación de los océanos y el reporte del indicador 14.3.1 del ODS 14 a través de proyectos regionales o nacionales financiados por el Organismo Internacional de Energía Atómica - OIEA.

3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Calidad “weather”: calidad de datos definida para identificar patrones espaciales relativos y variaciones a corto plazo. Es adecuado para zonas costeras, donde los procesos locales generan alta variabilidad.

mCP: púrpura de meta-Cresol

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica

REMARCO: Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y el Caribe.

[H⁺] = Concentración total de iones hidrógeno (mol kg⁻¹). En el agua de mar incluye la contribución del ion sulfato.

$$[H^+] = [H^+]_F \left(1 + \frac{S_T}{K_s} \right) \approx [H^+]_F + [HSO_4^-]$$

[H⁺]_F = Concentración libre (free) del ion hidrógeno en agua de mar.

S_T: Concentración total de sulfato.

K_s: Constante de disociación ácida del HSO₄⁻

pH_T = -log₁₀ [H⁺] donde [H⁺] representa la concentración total de iones hidrógeno en agua de mar.

T: Temperatura (K).

K: Escala de temperatura Kelvin = (°C + 273,15).

S: Salinidad (sin unidades).



H₂l: indicador.

HI⁻: estado protonado del indicador.

I²⁻: estado no protonado del indicador.

A: absorbancia.

λ: longitud de onda (nm).

ε_λ(x): Coeficiente de extinción o absorptividad molar para λ y la especie x del indicador.

K₂: Constante aparente de disociación del estado protonado del indicador.

pK₂: logaritmo base 10 de la constante de disociación del estado protonado del indicador.

pH_{NBS}: escala de pH basada en recomendaciones y soluciones buffers del US National Bureau of Standards (NBS), utilizada para soluciones de fuerza iónica cero.

4 FUNDAMENTO TEÓRICO

Uno de los métodos más precisos para determinar el pH en el agua de mar es a través de la técnica espectrofotométrica utilizando sulfonaftaleína, como por ejemplo el púrpura de meta-Cresol (mCP) (Figura 1. A). La técnica se basa en agregar un indicador de la forma H₂l en agua de mar, éste se equilibra en sus formas HI⁻ (estado protonado) y I²⁻ (estado no protonado), quedando una cantidad despreciable de H₂l.

Debido a que en el rango de pH de agua de mar natural el indicador mCP se comporta como un ácido débil monoprótico, la reacción de interés es la segunda disociación (Clayton and Byrne, 1993):

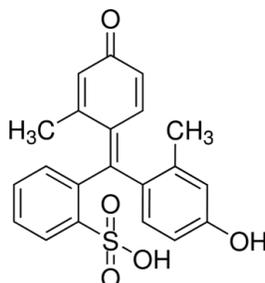


Se puede determinar entonces la concentración total de iones de hidrógeno de la muestra como:

$$pH = pK(HI^{-}) + \log_{10} \frac{[I^{2-}]}{[HI^{-}]} \quad (2)$$

La medición del pH se basa en la particularidad de que los iones HI⁻ y I²⁻ absorben a diferentes longitudes de onda de luz visible. Para el mCP los máximos de absorbancia para HI⁻ y I²⁻ ocurren a 434 y 578 nm, respectivamente (Figura 1. B). Por lo tanto, la relación entre estas absorbancias (R = A₅₇₈/A₄₃₄) puede ser utilizada para determinar el pH del agua de mar en la escala de concentración total de iones de hidrógeno (pH_T).

A



B

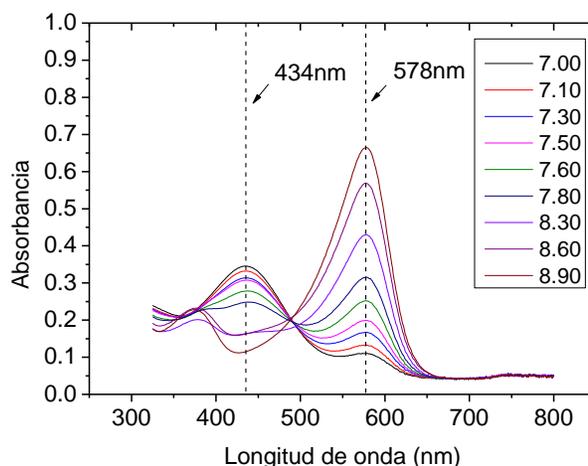


Figura 1. A. Estructura química del indicador mCP. B. Espectro de absorbanca UV-Vis del indicador mCP a diferentes valores de pH en agua destilada.

Para obtener una alta precisión en las mediciones de pH en agua de mar se recomienda el uso del indicador mCP purificado. En caso de no ser posible su adquisición, el mCP es comercializado con una pureza del 90% como una sustancia sólida, en su forma ácida y como sal de sodio. Entre las dos formas comerciales no purificadas, es recomendable utilizar la sal de sodio ya que es más soluble en medio acuoso (Douglas y Byrne 2017). Se debe considerar que las impurezas presentes en el mCP comercial absorben principalmente a 434 nm (longitud de onda de máxima absorción para la forma HI) y ya que el pH calculado de una muestra está directamente asociado con la relación de las absorbancias a 578 y 434 nm ($R = A_{578} / A_{434}$), producen una disminución en los valores de pH calculados respecto a los valores de pH reales (Douglas y Byrne, 2017). Por ello es necesario realizar una corrección para mejorar la exactitud de la medición, que se presentará más adelante en este protocolo.

5 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

5.1 Materiales

- Celda (o cubeta) de vidrio óptico o cuarzo, 1 cm de paso óptico con tapa
- Micropipeta automática de volumen ajustable entre 20-200 μL
- Pipeta automática de volumen ajustable entre 1000-5000 μL (ejemplo: Pipeta Gilson Pipetman Classic)
- Puntas de pipetas descartables
- Vaso de precipitado
- Matraz aforado
- Piseta (frasco lavador) con agua destilada
- Bolsas por ejemplo tipo Ziploc
- Guantes libres de polvo o talco
- Papel libre de fibras por ejemplo los de marca “Kimwipes”
- Cuaderno de anotaciones o registro primario de datos.

5.2 Reactivos

- Solución indicadora de púrpura de m-Cresol purificado (Peso Molecular: 382,43 g mol^{-1} , por ejemplo mCP purificado REMARCO, cesar.bernal@invemar.org.co) o comercial no purificado (sal de sodio mCP o también llamado sal de sodio m-Cresolsulfonftaleína, Peso Molecular: 404,41 g mol^{-1} , por ejemplo Número de CAS:62625-31-4, Sigma-Aldrich)
- Solución de NaOH a concentración de 0,1 mol L^{-1}
- Solución de HCl a concentración de 0,1 mol L^{-1}
- NaCl grado analítico
- Buffer pH 4,0
- Buffer pH 7,0
- Buffer pH 10,0
- Buffer Tris en agua de mar sintética (Dickson's lab, SCRIPPS Institute, La Jolla, CA, co2crms@ucsd.edu)
- Agua: usar agua de la mejor calidad posible. Por lo menos debe cumplir con conductividad $<5,0 \mu\text{S/cm}$ a 25 °C

5.3 Equipos

- Espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS™ 150 UV-Vis
- Portacelda individual termostata Thermo Scientific™ para espectrofotómetro GENESYS™

150 UV-Vis

- Baño termostático ($\pm 0,1$ °C o mejor), por ejemplo Julabo Corio CD-200F
- Termómetro para verificar temperatura dentro de la celda con resolución 0,01 °C que asegure la inmersión total del sensor en la celda de 1 cm de paso óptico, por ejemplo: Lutron modelo TM-917 con sensor Pt100 Luftman modelo 3636; Accumac modelo AM8010 con sensor AM1612.
- Medidor de pH con resolución mínima de 0,1 mV
- Balanza (0,0001 g)
- Agitador magnético (con calentador: opcional) y barra magnética

Los equipos y materiales necesarios para la medición de pH por método espectrofotométrico se muestran en la Figura 2. Algunos de ellos se incluyen en el kit REMARCO de Acidificación Oceánica.

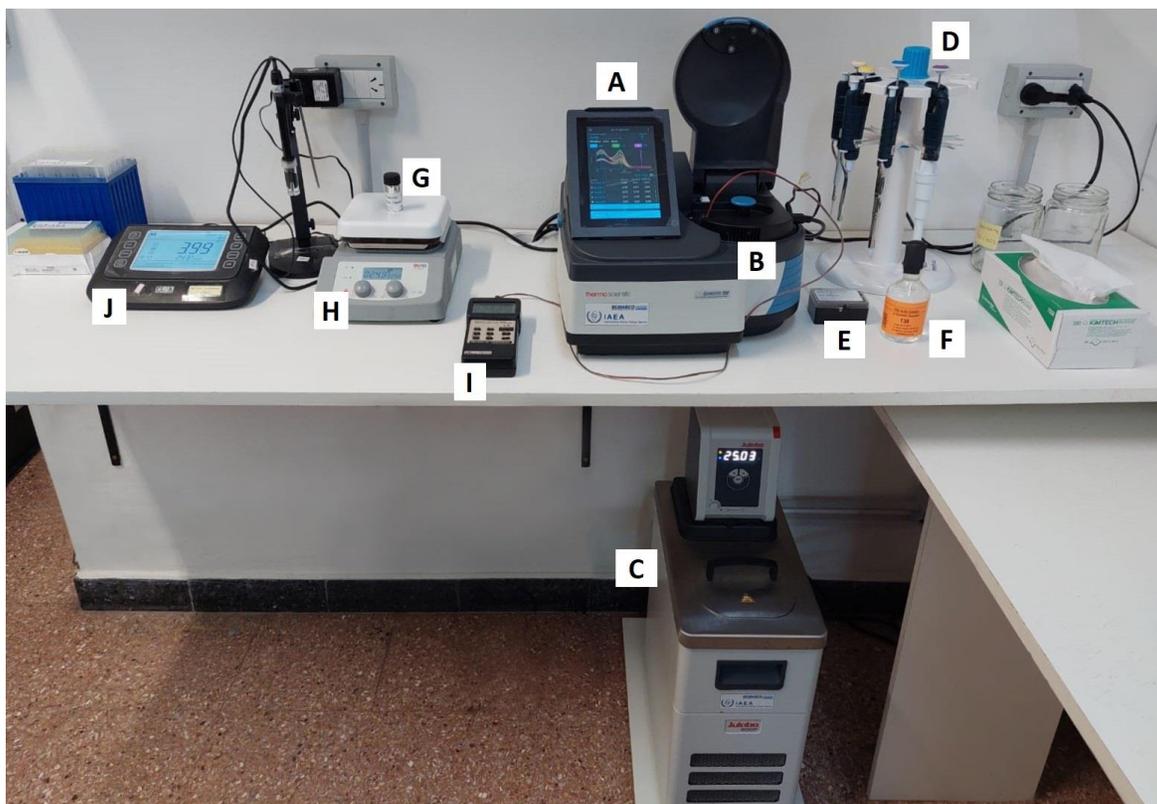


Figura 2. Equipos y materiales para medición de pH. A. Espectrofotómetro. B. Portacelda individual termostatada. C. Baño termostático. D. Pipetas automáticas. E. Celda de vidrio óptico de 1 cm de paso de luz. F. Buffer Tris en agua de mar sintética (Laboratorio Dickson). G. Indicador púrpura de meta-Cresol. H. Agitador magnético. I. Termómetro de precisión. J. pHmetro.

6 DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

6.1 Solución indicadora de mCP

El mCP se debe preparar en una matriz acuosa de fuerza iónica similar a la de la muestra a medir para reducir la perturbación del pH por la adición del indicador (Li et al., 2020). Esta perturbación podría ser importante considerando la relación volumen de muestra: volumen de indicador con la que se trabaja al utilizar celda de 1cm de paso óptico. Dependiendo de las características de su muestra, ajustar la fuerza iónica con la adición de NaCl (GOA-ON Manual for pH Determination Version 1.0).

Preparación de 100 mL de indicador mCP 2 mmol L⁻¹:

- Registrar datos del indicador mCP (fabricante, lote, Peso Molecular).
- Pesar 0,0762 g de indicador mCP purificado o 0,0809 g de sal de sodio del indicador mCP comercial no purificado, según disponibilidad.
- Agregar 90 mL de la matriz acuosa seleccionada y agitar con agitador magnético y platina calefactora a 25 °C. Por ejemplo, para muestras de agua de mar preparar la matriz acuosa de fuerza iónica similar a la misma con 4,09 g de NaCl en 100 mL de agua.
- Ajustar el pH de la solución indicadora a 8,2 en escala NBS para favorecer la completa disolución
- Dejar agitando durante toda la noche para permitir la estabilización del pH.
- Trasvasar a un matraz aforado y enrasar a 100 mL.
- Medir el pH y ajustar con HCl 0,1 mol L⁻¹ o NaOH 0,1 mol L⁻¹, según corresponda, a un valor aproximado ($\pm 0,1$) al que tiene la muestra a 25 °C. En el caso de agua de mar de pH cercanos a 8,1, el ajuste se realiza a 7,9 ($\pm 0,1$).
- Trasvasar a un frasco de vidrio de preferencia color ámbar o cubrir con papel aluminio para protegerlo de la luz.
- Rotular el frasco con los datos de concentración, fecha de preparación y analista.
- Almacenar protegido de la luz y refrigerado a una temperatura de 2 a 6 °C. No congelar.

Nota 1: La solución puede durar meses (GOA-ON Manual for pH Dye Preparation Version 1.0) pero idealmente debe ser preparada antes de su utilización para evitar descomposición del colorante o contaminación microbiana (Douglas y Byrne, 2017). Se recomienda preparar un volumen acorde al uso del indicador en su laboratorio y fraccionar en pequeños volúmenes a utilizar por día de medición.

6.2 Preparación de los equipos

Evaluar las condiciones del espacio de trabajo para garantizar que la temperatura de la muestra durante la medición sea de 25,0 °C acorde a las capacidades de la institución. Bajo las siguientes condiciones se han obtenido resultados confiables:

- Ajustar la temperatura ambiente del área de medición a 25,0 °C.

- Conectar el baño termostático y configurar a 25,0 °C según las indicaciones del manual del equipo.
- Colocar dentro del baño termostático en bolsas Ziploc, buffer Tris en agua de mar sintética, solución de mCP 2mM previamente preparada y ajustada a pH 7,9 como se indica en la sección 6.1 (Solución indicadora de mCP) y las muestras de agua de mar a analizar. Asegurarse de que el tiempo de aclimatación sea suficiente para alcanzar la temperatura deseada.

6.3 Medición de pH_T en la muestra

Las muestras serán colectadas, preservadas y almacenadas siguiendo el método descrito en REMARCO-AO-P-01 “Recolección y Preservación de Muestras para la Medición de Variables del Sistema de CO₂ en Aguas Marino-Costeras” (Sánchez-Noguera, 2021).

La configuración específica para el equipo Genesys 150 puede verse en el ANEXO 10.1.

Se recomienda realizar mediciones de pH por duplicado (muestras de dos botellas independientes en cada punto del sitio de muestreo). Para cada muestra es necesario realizar tres mediciones de pH utilizando la siguiente secuencia:

- a. Lavar la celda 2 veces con la muestra a analizar y secar.
- b. Con el portacelda vacío ajustar a cero.
- c. Adicionar en la celda 3,5 mL de muestra previamente atemperada a 25 °C (ver sección 6.2) de forma suave, evitar generación de burbujas y proceder a tapar la celda.

Nota 2: Es recomendable tomar la muestra de la sección correspondiente al último tercio de la botella. Una vez utilizada, volver a colocar la botella de muestra al baño térmico para mantener su temperatura para las mediciones que se realizarán posteriormente.

- d. Limpiar y secar la celda con muestra con papel libre de fibras y colocarla en el Peltier (verificar que la orientación permita el paso de luz). Colocar siempre la celda en el mismo sentido guiándose con el código que aparece en el extremo superior de una de sus caras.
- e. Realizar una medición a 434, 578 y 730 nm para obtener las absorbancias en la muestra de agua de mar sin adición de indicador (muestra).

Nota 3: 434 y 578 nm corresponden a los máximos de absorbancia de mCP en sus formas HI^- (estado protonado) y I^{2-} (no protonada), respectivamente. 730 nm corresponde a una longitud de onda a la cual el mCP no absorbe.

- f. Quitar la tapa de la celda y sin retirar del Peltier medir la temperatura de la muestra dentro de la celda utilizando un termómetro de precisión con sensor que permita mediciones en volúmenes pequeños. Esta será considerada como temperatura inicial de medición (T_i).

- g. Quitar el sensor de termómetro, limpiarlo y colocarlo en el baño térmico hasta la siguiente medición.
- h. Retirar la celda del peltier y con una micropipeta automática adicionar de forma suave y evitando la generación de burbujas un volumen del indicador mCP que permita obtener valores de absorbancia en 0,400 y 1,000 para las longitudes de 434 y 578 nm (Dickson et al., 2007; Rérolle et al., 2012).
- i. Colocar la tapa de la celda y mezclar por inversión realizando una única maniobra, asegurando que la mezcla sea homogénea. Colocar rápidamente en el Peltier y medir la absorbancia a 434, 578 y 730 nm en la muestra de agua de mar tras la primera adición de indicador (muestra + mCP).

Nota 4: La diferencia entre la absorbancia a 730 nm de la muestra y la muestra + mCP debe estar entre -0,003 y +0,003. Caso contrario remover la celda y limpiar bien las ventanas ópticas.

- j. Repetir el procedimiento descrito en (h) y medir la absorbancia a 434, 578 y 730 nm en la muestra de agua de mar tras la segunda adición de indicador (muestra + 2mCP).

Nota 5: Para muestras con valores de absorbancia menores a 0,100 (previo a la adición de indicador) se obtuvieron absorbancias entre 0,400 y 1,000 luego de la primera (muestra + mCP) y la segunda adición del indicador mCP (muestra + 2mCP) adicionando un volumen de indicador mCP de 56,0 uL como máximo para cada adición (relación sugerida en GOA-ON Manual for pH Determination Version 1.0). El volumen del indicador se debe ajustar de acuerdo a la absorbancia inicial de su muestra para cumplir con las mediciones de absorbancia dentro de los rangos sugeridos.

- k. Quitar la tapa de la cubeta y sin retirar del Peltier medir la temperatura de la muestra dentro de la celda utilizando un termómetro de precisión. Esta será considerada como temperatura final de medición (T_f). Se espera que la diferencia entre la T_i y T_f sea de $\pm 0,1$ °C.

6.4 Verificación del método con Buffer TRIS

Verificar el método de pH_T con buffer TRIS leído por triplicado al inicio y al final del día de medición.

- a. Registrar el número de botella, lote, fecha de elaboración, fecha de apertura del Buffer TRIS y analista.
- b. Con el buffer TRIS previamente aclimatado a 25 °C proceder con el procedimiento descrito en la sección 6.3 (Medición de la muestra).
- c. Comparar el valor medido con el valor teórico $pH_T = 8,094 \pm 0,006$ a Salinidad= 35 y Temperatura= 25 °C (DeValls y Dickson, 1998).

6.5 Obtención de datos y cálculos de pH_T

6.5.1 Registro de datos

- a. Identificación de muestra
- b. Valor de salinidad de la muestra obtenido en campo
- c. T_i y T_f de medición
- d. Datos de absorbancia de la muestra, luego de la primera y la segunda adición del indicador mCP medidos a través de un registro manual o bien el equipo Genesys 150 permite su extracción a través de su conexión con Wifi o USB. Revisar el manual del usuario del equipo para este procedimiento. Se obtendrá un archivo Excel con los valores de absorbancia medidos que serán utilizados para el cálculo de pH_T .

6.5.2 Cálculos

El cálculo del pH se obtiene usando la constante de disociación ácida del indicador mCP (K_2), los coeficientes de extinción del mCP (ϵ) y el cociente de las absorbancias del indicador mCP (R), mediante la expresión descrita por Liu et al. (2011) que ha sido establecida para un rango acorde a las zonas de estudio del grupo REMARCO ($20 \leq \text{Salinidad} \leq 40$ y $5 \leq \text{Temperatura} \leq 35$ °C).

6.5.2.1 Determinación del pH de la muestra

El pH de la muestra con el indicador se determina usando la fórmula:

$$pH_T = -\log(K_2^T e_2) + \log\left(\frac{R - e_1}{1 - R \frac{e_3}{e_2}}\right) \quad (3)$$

Donde:

$$-\log(K_2^T e_2) = a + \left(\frac{b}{T}\right) + c \ln T - dT \quad (4)$$

$$a = -246,64209 + 0,315971S + 2,8855x10^{-4}S^2 \quad (5)$$

$$b = 7229,23864 - 7,098137S - 0,057034S^2 \quad (6)$$

$$c = 44,493382 - 0,052711S \quad (7)$$

$$d = 0,0781344 \quad (8)$$

$$e_1 = -0,007762 + 4,5174x10^{-5}T \quad (9)$$

$$e_3/e_2 = -0,020813 + 2,60262 \times 10^{-4} T + 1,0436 \times 10^{-4} (S - 35) \quad (10)$$

El cociente de las absorbancias R se determina mediante la ecuación:

$$R = \frac{(A_{578,mCP} - A_{578,muestra}) - (A_{730,mCP} - A_{730,muestra})}{(A_{434,mCP} - A_{434,muestra}) - (A_{730,mCP} - A_{730,muestra})} \quad (11)$$

Para ello se restan las mediciones de absorbancia de la muestra sin indicador ($A_{\lambda,muestra}$) a las mediciones de absorbancia posterior a la adición del indicador $A_{\lambda,mCP}$ en las 3 longitudes de onda (434, 578 y 730 nm). A la absorbancia medida en las longitudes de onda de 434 y 578 nm restar la absorbancia medida a 730 nm. Esto permite corregir cualquier cambio de línea base debido a errores instrumentales.

Las correcciones de cálculos de pH por adición del indicador mCP y el uso de indicador mCP no purificado se encuentran descritas en el Anexo de este protocolo.

6.5.2.2 Incertidumbre de la muestra

En este protocolo consideraremos necesario para la estimación de incertidumbres contar con 10 mediciones repetidas de salinidad, temperatura y absorbancia sobre una muestra. En el caso de la salinidad corresponden a 10 valores medidos en el campo al momento de su recolección, mientras que para la temperatura será considerada la del análisis. Se recomienda realizar una medición del T_i y 10 mediciones de T_f . De esta manera se agiliza el proceso y se evita que la muestra pueda llegar a sufrir alteraciones por su interacción con la atmósfera. Las repeticiones de absorbancia corresponden a 10 lecturas realizadas de forma manual en el equipo Genesys 150, correspondientes a la muestra, 10 lecturas tras la primera adición de indicador y 10 lecturas tras la segunda adición de indicador.

Una opción es estimar la incertidumbre midiendo la repetibilidad en cada una de las muestras analizadas, como se describió anteriormente. Una segunda opción se basa en medir la repetibilidad en una única muestra y utilizar dichos valores para el cálculo de la incertidumbre de las muestras restantes analizadas en el mismo día. En caso de que ninguna de estas opciones sea viable, una tercera opción será considerar los errores de los equipos y materiales empleados de medición para su cálculo. Con la primera opción se reduce notablemente la incertidumbre; sin embargo, con la segunda opción se obtienen buenos resultados con la ventaja adicional de reducir el tiempo de medición.

Para el cálculo de incertidumbre utilice la planilla de REMARCO “pH-Cálculo-y-estimación-de-incertidumbre_REMARCO” (Cartas et al., 2021).

7 CONTROL DE CALIDAD

Es necesario mantener un control de calidad del sistema de medición de pH considerando diversos aspectos:

- Mantener un registro detallado de la metodología aplicada y cada ajuste realizado durante el procedimiento.
- Ser rigurosos en la toma de datos de manera de facilitar la identificación de datos anómalos.
- Evaluar precisión a través de la repetibilidad entre réplicas. Como se mencionó en el procedimiento, se sugiere realizar la medición de pH por triplicado para cada muestra proveniente de una botella y se espera obtener un desvío estándar menor a 0,01.
- Evaluar precisión realizando la medición de dos réplicas de una muestra, correspondientes a dos botellas independientes.
- Evaluar veracidad a través de la medición de pH_T de buffer TRIS (Laboratorio Dickson) de valor teórico conocido y comparar con el valor medido.

8 MANEJO DE RESIDUOS

Se recomienda que las muestras de agua de mar utilizadas para la aplicación de este protocolo no sean fijadas, sean medidas dentro de las 24 horas de haber sido tomadas y por lo tanto sus residuos no requieran ningún tratamiento particular. Sin embargo, en caso de no ser posible su medición inmediata y haber sido fijadas con cloruro de mercurio, sus residuos se deben almacenar en recipientes adecuados, debidamente rotulados y proseguir con el protocolo que se indique en su laboratorio para la disposición final segura de los mismos.

9 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Cartas H., Sanchez-Cabeza, J.A., Martínez R., Gómez M., Perez E., Herrera J., Ruiz G., Bernal C. (2021). Excel book for the calculation of pH measured by spectrophotometry and uncertainties by the Kragten method. Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y El Caribe – REMARCO. Cienfuegos, Cuba. <https://remarco.org/manual-ao/>

DelValls T.A., Dickson A.G. (1998). The pH of buffers based on 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol ('tris') in synthetic sea water. Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap., 45(9), 1541– 1554. doi:10.1016/S0967-0637(98)00019-3.

Dickson A.G., Sabine C. L. Christian J. R. (2007). Guide to best practices for ocean CO₂ measurements. PICES Special Publication 3, 3(8), 191. doi:10.1159/000331784.

Douglas N.K., Byrne R.H. (2017). Achieving accurate spectrophotometric pH measurements using unpurified meta-cresol purple. Marine Chemistry 190, 66-72.

GOA-ON Manual for pH Determination of the pH of sea Determination Version 1.0: water using the indicator dye m-cresol purple. http://www2.goaon.org/documents/kits/ph_determination_manual.pdf, n.d.

GOA-ON Manual for pH Dye Preparation - Version 1.0. Preparation of indicator dye, m-cresol purple, for use in the spectrophotometric determination of the pH of sea water. http://www.goaon.org/documents/kits/ph_dye_preparation_manual.pdf, n.d.

Gómez M., Sanchez-Cabeza J.A., Cartas H., Pérez, E., Ruiz G., Herrera J., Bernal C. (2021). Determinación espectrofotométrica de pH en agua de mar utilizando indicador púrpura de meta-cresol purificado y un espectrofotómetro Ocean Optics. Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y El Caribe – REMARCO. Santa Marta, Colombia. 20 pp. <https://remarco.org/manual-ao/>

Li, X., García-ibáñez M. I., Carter B. R., Li Q., Easley R. A., Cai W. (2020). Purified meta-cresol purple dye perturbation: How it influences spectrophotometric pH measurements. *Mar. Chem.*, 103849. doi:10.1016/j.marchem.2020.103849.

Liu X., Patsavas M. C., Byrne R. H. (2011). Purification and Characterization of meta-Cresol Purple for Spectrophotometric Seawater pH Measurements. *Environmental Science & Technology* 45 (11), 4862-4868. doi: 10.1021/es200665d

Rérolle V. M. C., Floquet C. F. A., Mowlem M. C., Connelly D. P., Achterberg E. P., Bellerby R. R. G. J. (2012). Seawater-pH measurements for ocean-acidification observations. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 40, 146–157. doi:10.1016/j.trac.2012.07.016.

Sánchez-Noguera C. (2021). Recolección y preservación de muestras para la medición de variables del sistema de CO₂ en aguas marino - costeras. Red de Investigación de Estresores Marinos - Costeros en Latinoamérica y El Caribe – REMARCO. Santa Marta, Colombia. 17 pp. <https://remarco.org/manual-ao/>.

10 ANEXOS

10.1 Configuración del espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS™ 150 UV-Vis

Colocar el portacelda termostataado Peltier en el espectrofotómetro (Figura 3). Revisar el manual del usuario para realizar una correcta conexión de la misma. Recordar que siempre que el Peltier esté colocado, la tapa del espectrofotómetro debe permanecer abierta.

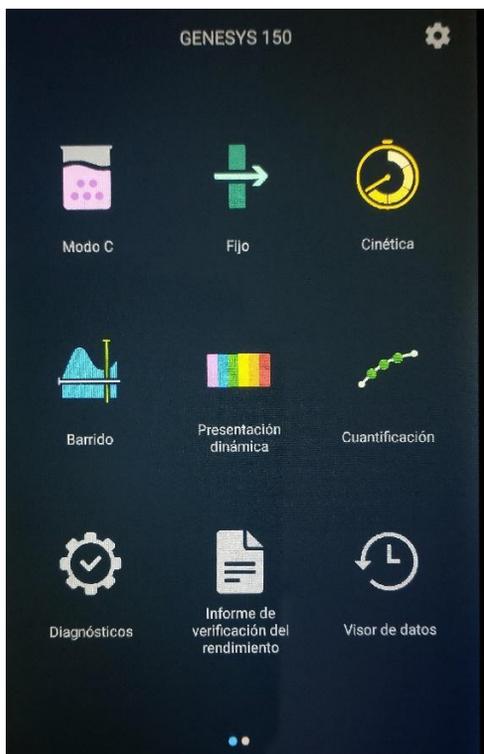


Figura 3. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS™ 150 UV-Vis- con portacelda termostataado Peltier instalado (izquierda). Detalle de celda de 1cm de paso óptico ubicada en el portacelda termostataado (derecha).

10.1.1 Modo barrido

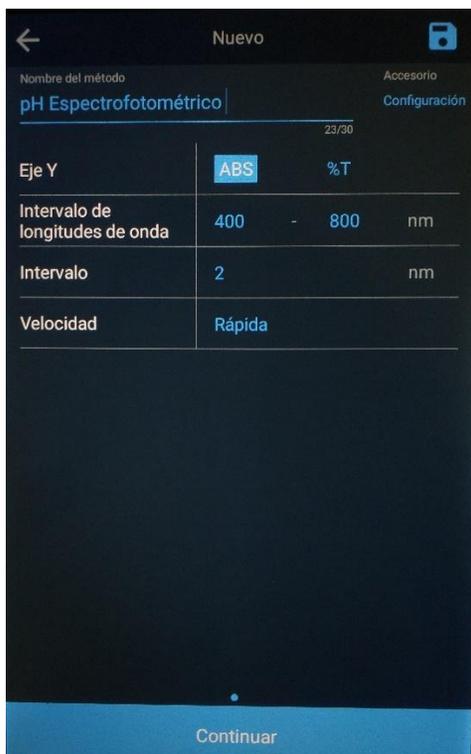
Encender el espectrofotómetro 30 minutos antes de comenzar las mediciones.

En la pantalla inicial seleccionar el modo "Barrido".



Seleccionar el ícono “+” para configurar el método, asignar un nombre al protocolo y modificar los siguientes parámetros:

Eje Y	ABS %T
Intervalo de longitudes de onda	400- 800 nm
Intervalo	2 nm
Velocidad	rápida



Ingresar a Configuración del accesorio en la esquina superior derecha y seleccionar “Peltier”. Una vez allí, ajustar los parámetros con los siguientes valores:

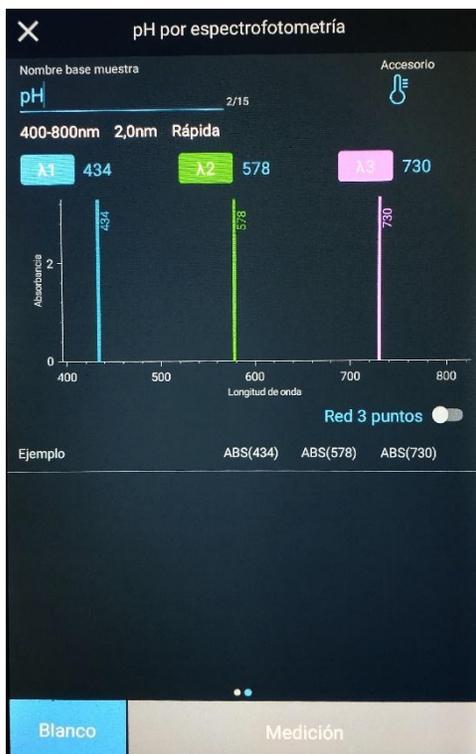
Temperatura de referencia	25 °C
Tiempo de equilibrio	0
Tolerancia de Temperatura	0.5
Velocidad de agitación	0



The screenshot shows a mobile application interface with a dark background. At the top, there is a back arrow and the title "Peltier". Below this is a table with four rows, each representing a different parameter. The values are displayed in a light blue color.

Parameter	Value	Unit
Valor de referencia de temperatura	25,0	°C
Tiempo de equilibrio	0,0	Minutos
Tolerancia de temperatura	0,5	°C
Velocidad de agitación	Desactivado	

Esta configuración del método puede ser guardado en el equipo para su posterior uso, sin embargo, se debe considerar que cada vez que se usa en el modo barrido se deben seleccionar las longitudes de onda que deseamos sean mostradas en pantalla presionando sobre longitud λ_1 , λ_2 y λ_3 , ingresando 434, 578 y 730nm, respectivamente. De esta manera será posible visualizar el espectro de absorción de interés durante las mediciones lo que permitirá verificar los máximos de absorbancia esperados para el indicador.



10.1.2 Modo longitudes de onda múltiples

- Encender el espectrofotómetro y en la pantalla seleccionar el modo “longitudes de onda múltiples”.
- Seleccionar el ícono “+” para configurar el método, asignar un nombre al protocolo e ingresar las longitudes de onda 434, 578 y 730 nm
- Ingresa a Configuración del accesorio “Peltier” y ajustar los parámetros como se indica en la sección 12.2.1.

10.1.3 Lectura de muestras

Para modo barrido y modo longitudes de onda múltiples:

- Presionar “Blanco” para obtener el cero de medición.
- Para obtener los valores de absorbancia de interés presionar “Medición”.

10.2 Corrección de la perturbación del pH por adición del indicador

La adición del indicador mCP provoca una perturbación del pH de la muestra (Li et al., 2020). A pesar de que la magnitud de perturbación se reduce al utilizar un indicador de fuerza iónica y pH similares a la muestra, se recomienda realizar una corrección con una segunda adición del indicador mCP, como fue descrito en este protocolo.

Las adiciones de indicador mCP sucesivas constituyen un método empírico (Clayton and Byrne, 1993; Dickson et al., 2007) que permite calcular el cambio del cociente de las absorbancias R (ecuación 11) tras la segunda adición del indicador. Para ello se calcula el R para cada uno de los dos volúmenes (V_1 y V_2) de las dos adiciones sucesivas del indicador mCP (1mCP y 2mCP) y se extrapola a cero adiciones de indicador con el objetivo de determinar el valor del cociente de absorbancia corregido (R_{corr}) para cero adición de indicador, con el cual es posible calcular el pH que se hubiese obtenido sin adición del indicador.

El método se basa en dos supuestos: 1) R está relacionado linealmente con el volumen de indicador adicionado y 2) el cambio en R sobre el volumen de indicador añadido ($\frac{\Delta R}{\Delta V}$) es una función lineal simple de R (Li et al., 2020).

La primera medición corresponde a la relación de absorbancia (R_{1mCP}) de la muestra de agua de mar con la primera adición del indicador (V_1 , mL) y la segunda corresponde a la medición de la relación de absorbancias (R_{2mCP}) que se realiza después de la segunda adición del indicador (V_2 , mL). Los cambios en R por mL de indicador adicionado, es decir:

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = \left(\frac{R_{2mCP} - R_{1mCP}}{V_2 - V_1} \right) \quad (12)$$

se puede expresar en función de R_{1mCP} :

$$\frac{\Delta R}{\Delta V} = a + b * R_{1mCP} \quad (13)$$

Esta relación puede calcularse para cada muestra para obtener los R_{corr} según la siguiente relación, basada en el supuesto 2) mencionado anteriormente:

$$R_{corr} = R_{1mCP} - (a + b * R_{1mCP}) * V_1 \quad (14)$$

Esta corrección está incluida en el cálculo de pH_T en la planilla de REMARCO “pH-Cálculo-y-estimación-de-incertidumbre_REMARCO” (Cartas et al., 2021).

10.3 Corrección por utilización del indicador mCP no purificado según Douglas y Byrne (2017)

En caso de utilizar para la determinación de pH el indicador mCP no purificado, es necesario realizar una corrección de los valores de absorbancia obtenidos, ya que las impurezas pueden absorber a la misma longitud de onda que el indicador, principalmente a 434 nm, modificando así el valor de pH calculado para la muestra.

Para realizar esta corrección, debe cuantificarse dicha contribución específicamente para el lote de mCP con el que se está trabajando. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- a. Preparar una solución de NaCl 0,7 M y ajustar a pH=12 a 25,0 °C con la adición de NaOH 0,1 M.
- b. Realizar la preparación de equipos como se describe en 6.2.
- c. Proceder a la medición del pH de la solución NaCl 0,7 M como se indica en la sección 6.3
- d. A las absorbancias de la solución de NaCl a 434, 578 y 730 nm las llamaremos A_{obs} (absorbancias observadas).
- e. Con las absorbancias observadas, calcular R_{obs} (R observado), como:

$$R_{obs} = \frac{A_{578\ obs}}{A_{434\ obs}} \quad (15)$$

- f. Calcular la relación e_3/e_2 (ecuación 10). Donde S es la salinidad de la solución de NaCl.

$$e_3/e_2 = -0,020813 + 2,60262 \times 10^{-4} T + 1,0436 \times 10^{-4} (S - 35)$$

- g. Calcular el valor específico de absorbancia a 434 nm del lote de mCP no purificado como

$$A_{434\ imp} = \left(1 - e_3/e_2 * R_{obs}\right) * A_{434\ obs} \quad (16)$$

- h. Una vez calculada la contribución de las impurezas a la absorbancia a 434 nm, este valor debe ser utilizado para modificar el valor de absorbancia a 434 que se obtiene al medir la muestra. Calcular el pH de la muestra siguiendo el procedimiento de la sección 6.5.2 modificando el valor de R de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = R_{obs} * \left(1 + \frac{A_{434\ imp}}{A_{434\ obs} - A_{434\ imp}}\right) \quad (17)$$